

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

18 March 1999 (18.03.99)

International application No.:

PCT/JP98/04118

Applicant's or agent's file reference:

CGS 98-03 PCT

International filing date:

11 September 1998 (11.09.98)

Priority date:

11 September 1997 (11.09.97)

Applicant:

FUKUSHIMA, Naoshi et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

27 October 1998 (27.10.98)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

EP

US

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 CGS98-03PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP98/04118	国際出願日 (日.月.年) 11.09.98	優先日 (日.月.年) 11.09.97
出願人(氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C07K 16/18, C07K 16/28, C12N 5/20, A61K 39/395
//C12P 21/08, C12N 15/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C07K 16/18, C07K 16/28, C12N 5/20, A61K 39/395,
C12P 21/08, C12N 15/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 97/32601, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK) 12. 9 月. 1997 (12. 09. 97) & JP, 9-295999, A & AU, 9722325, A	1-6
A	Journal of Cell Science vol. 108 No. 11 (1995) Martina I. Reinhold et al. "In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47)" p3419-3425	1-6

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に及ぼす文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献。

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 12. 98

国際調査報告の発送日

22. 12. 98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

REC'D 27 SEP 1999

WIPO PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 CGS98-03PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP98/04118	国際出願日 (日.月.年) 11.09.98	優先日 (日.月.年) 11.09.97
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁸ C07K 16/18, C07K 16/28, C12N 5/20, A61K 39/395 //C12P 21/08, C12N 15/06		
出願人(氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☒ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.10.98	国際予備審査報告を作成した日 10.09.99	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 小暮 道明 印	4B 9358
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-6 有
請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-6 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-6 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-6に記載された発明は国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献を組み合わせることにより当業者が容易に発明できたものでもない。

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
W0, 97/32601, A1	(12. 09. 97)	(06. 03. 97)	(06. 03. 96)

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

VIII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

この出願の請求の範囲 2 には、「IAP を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する・・・ペプチド、および低分子化合物」との記載がある。

しかし、該ペプチド及び低分子化合物については、明細書に何ら具体的な記載がなく、また、その調製方法も具体的には何ら記載されていない。

したがって、該ペプチド及び低分子化合物については、明細書による十分な裏付けがあるものとは認められない。



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C07K 16/18, 16/28, C12N 5/20, A61K 39/395 // C12P 21/08, C12N 15/06</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/12973</p> <p>(43) 国際公開日 1999年3月18日(18.03.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04118</p> <p>(22) 国際出願日 1998年9月11日(11.09.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/264853 1997年9月11日(11.09.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 福島 直(FUKUSHIMA, Naoshi)[JP/JP] 宇野慎介(UNO, Shinsuke)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門一丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: MONOCLONAL ANTIBODY INDUCING APOPTOSIS</p> <p>(54)発明の名称 アポトーシスを誘起するモノクローナル抗体</p> <p>(57) Abstract A monoclonal antibody which is an antibody specifically recognizing human integrin associated proteins and is an antigen inducing the apoptosis of nucleated blood cells having the human integrin associated proteins. Therefore, it is useful as an antibody, which specifically recognizes the human integrin associated proteins, in discriminating and identifying these proteins. Owing to the effect of inducing the apoptosis of nucleated blood cells, the above antibody is also usable as remedies, etc. in the fields of, for example, treating myelocytic leukemia and lymphatic leukemia.</p> <div data-bbox="1136 1197 1396 1890"> </div>		

本発明のモノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識する抗体であり、ヒト Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす抗原である。従って、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するのに有用であると共に、有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす作用を有することから、当該特性を利用して、骨髓性白血病およびリンパ系白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノールウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

アポトーシスを誘起するモノクローナル抗体

技術分野

5 本発明は、 Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性を有する新規モノクローナル抗体、ならびにその断片、ペプチドおよび低分子化合物、および当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。当該新規抗体は、骨髓性白血病およびリンパ性白血病の治療薬等として有用である。

背景技術

10 従来、顆粒球コロニー刺激因子、例えば、遺伝子組換え型顆粒球コロニー刺激因子 (rG-CSF) は、主に顆粒球系細胞の分化、増殖を促進させる液性因子として知られている。また、マウスの *in vivo* の実験に基づき、当該 rG-CSF を投与することにより、骨髓の造血亢進のみならず、脾臓でも著しい髄外造血が起こり造血幹細胞を始めとしてすべての造血前駆細胞が脾臓で増殖することが報告されている。係る脾臓での髄外造血のメカニズムとして、rG-CSF の刺激により脾臓の造血微小環境が変化し、造血支持能力が亢進したことにより造血が生じたものであると考えられた。

20 そこで、本発明者は、当該脾臓での造血機能を解明するため、rG-CSF 連投後の脾臓の間質細胞に着目し、間質細胞を介した rG-CSF による造血機能亢進の解析を試みるべく、rG-CSF を連投したマウス脾臓より造血間質細胞株 (CF-1 細胞) を樹立し、係る造血間質細胞を用いてその造血支持能を検討したところ、*in vitro* でのコロニー刺激活性および *in vivo* での造血幹細胞支持能を認めた [Blood, 80, 1914 (1992)]。

25 しかし、当該脾臓間質細胞については、その一部が細胞株 (CF-1 細胞) として樹立され、その細胞学的特性の検討等はなされているが、当該細胞表面抗原を認識する特定の抗体を作製することは全く行われておらず、ましてやその特性

等については未だ全く知られていなかった。

発明の開示

そこで、本発明者は、脾臓間質細胞に関する前記知見と、従来の研究結果を踏まえ、脾臓間質細胞を識別し得る特定の抗体を開発することを目標として鋭意研究し、当該脾臓間質細胞株を感作抗原とするモノクローナル抗体の作製を試み、新規モノクローナル抗体を取得することに成功した。

さらに、前記取得されたモノクローナル抗体の特性について検討し、当該モノクローナル抗体は、骨髓系細胞にアポトーシスを誘起する特性を有するものであることを見出した。以下、当該モノクローナル抗体をBMAP-1抗体と命名し、使用する。

さらに、前記BMAP-1抗体が認識する抗原について検討し、直接発現クローニング(Direct Expression Cloning)により、マウスIntegrin Associated Protein(マウスIAP)(Genbank、Accession Number Z25524)であることを見出した。

さらに、前記BMAP-1抗体の作用を、マウスIAPを遺伝子導入した組み換え体細胞を用いて検討した。すなわち、マウスIAPを発現していないJurkat細胞に、常法によりマウスIAP遺伝子を導入し、マウスIAPを発現する細胞株(Recombinant Jurkat Cell)を作製し、BMAP-1抗体の当該マウスIAP発現細胞に対する作用をMTS法およびフローサイトメトリーによるDNA断片化の検索により検討した(特願平9-67499)。

以上の知見に基づき、ヒトのIntegrin Associated Protein(以下ヒトIAPとする; J. Cell Biol., 123, 485-496, 1993にアミノ酸配列および塩基配列は記載; Journal of Cell Science, 108, 3419-3425, 199

5) を抗原とするモノクローナル抗体は、当該抗原を発現する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起する効果があるとの予想に基づき、本発明者は、ヒト Integrin Associated Protein を抗原としてモノクローナル抗体の作製を試み、当該抗原を有するヒト有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体を得ることに成功した。

すなわち、本発明は、ヒトの Integrin Associated Protein（ヒト IAP）を有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起させる特性を有する新規モノクローナル抗体およびその断片、更には、当該モノクローナル抗体を産生させるハイブリドーマを提供することを目的とするものである。

係る新規モノクローナル抗体は、骨髓性白血病およびリンパ性白血病の治療薬等として有用である。

さらに、Integrin Associated Protein の機能としては、インテグリンの $\alpha V \beta 3$ の β 鎖に結合し $\alpha V \beta 3$ とそのリガンド (Ligand) であるビトロネクチン (Vitronectin) との結合を支持する作用 (J. Cell. Biol., 123, 485-496 (1993))、好中球と血管内皮との接着に際し血管内皮に Ca^{2+} の流入を誘導する作用 (J. Biol. Chem., 268, 19931-19934 (1993))、あるいは好中球が血管内皮を通過することを支持する作用が報告されているが (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3978-3982 (1995))、有核血液細胞についてのアポトーシスに関する機能は報告されていない。

すなわち、本発明に係るモノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識する抗体である。従って、ヒト Integrin Associated Protein の識別、及び同定する機能を有するものである。

さらに、本発明のモノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）のアポトーシスを誘起する特性を示す抗体である。ここで、アポトーシス（apoptosis）とは、核クロマチンDNAがヌクレオソーム単位で切断（いわゆるラダー・フォーメーション）され、その結果、細胞を死に至らしめる現象で、細胞自滅とも云われる現象である。

従来、有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起する特性を有するモノクローナル抗体として知られているものに、抗 Fas 抗体（Cell, 66, 233-243, 1991）、抗 CD43 抗体（Blood, 86, 502-511, 1995）、抗 HLA Class I α 1 Domain（Blood, 90, 726-735, 1997）抗体等があるが、本発明に係る、Integrin Associated Protein を認識する抗体が有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性については全く知られていない。従って、本発明に係るモノクローナル抗体は、Integrin Associated Protein を特異的に認識可能な抗体であり、また、Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起する特性を有するすべてのモノクローナル抗体を包括するものとして定義される。

さらに 本発明に係る抗体は、すべての有核血液細胞にアポトーシスを誘起するもののみに限定されない。少なくとも一種の有核血液細胞にアポトーシスを誘起するものも含まれる。具体的には、骨髓性白血病ならば少なくとも骨髓系細胞にアポトーシスを誘起すればよい。

より詳しくは、本発明は、Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体を提供するものである。

さらに、本発明は、Integrin Associated Protei

n (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体断片、ペプチド、および低分子化合物を提供するものである。

また、本発明は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供するものである。

さらに、本発明は、IAPに結合してIAPの作用を亢進させ、有核血液細胞にアポトーシスを誘起する物質を含有する抗白血病治療剤を提供するものである。

また、本発明は、上記の物質がモノクローナル抗体であることを特徴とする抗白血病治療剤を提供するものである。

さらに、本発明は、上記の物質がモノクローナル抗体断片、ペプチド、低分子化合物であることを特徴とする抗白血病治療剤を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、HL-60細胞株のmRNAより作製したcDNAからPCR法で増幅したヒトIAPのバンドを示す電気泳動写真である。左側より分子量マーカー (M)、ヒトIAP (1)、 β アクチン (2) を示す。

図2は、ヒトIAPを発現させたL1210細胞の抗CD47抗体によるヒトIAPの発現量を示す図である。ピークは、対照としてpCOS1のみを遺伝子導入したL1210細胞を示す。

図3は、ヒトIAPを発現させたL1210細胞の抗CD47抗体によるヒトIAPの発現量を示す図である。ピークは、ヒトIAP遺伝子を導入したL1210細胞で明らかにヒトIAPの発現量が増加していることを示す。

図4は、免疫マウスでの抗体価を示す図である。左側のピークは、Intact L1210細胞。右側のピークはヒトIAPを発現させたL1210細胞であり、細胞融合に供したマウスの血清は明らかにヒトIAPを認識していることを示す。

図5は、ハイブリドーマの培養上清を用いての増殖抑制実験 (Jurkat

細胞)を示す図である。

図6は、ハイブリドーマの培養上清を用いての増殖抑制実験(A R H 7 7細胞)を示す図である。

5 図7は、培養上清によるJ u r k a t細胞に対するアポトーシス誘起作用(P I染色による解析)を示す図であり、対照とした8 G 2の培養上清の場合の結果を示す。R 1はアポトーシスの比率(%)を示し、7. 4 3%である。

図8は、培養上清によるJ u r k a t細胞に対するアポトーシス誘起作用(P I染色による解析)を示す図であり、7 D 2 - E 3の場合の結果を示す。R 1はアポトーシスの比率(%)を示し、9. 8 4%である。

10 図9は、培養上清によるJ u r k a t細胞に対するアポトーシス誘起作用(P I染色による解析)を示す図であり、1 1 C 8の場合の結果を示す。R 1はアポトーシスの比率(%)を示し、1 5. 3 2%である。

15 図10は、培養上清によるH L - 6 0細胞に対するアポトーシス誘起作用(P I染色による解析)を示す図であり、対照とした8 G 2の培養上清の場合の結果を示す。M 1はアポトーシスの比率(%)を示し、6. 9 4%である。

図11は、培養上清によるH L - 6 0細胞に対するアポトーシス誘起作用(P I染色による解析)を示す図であり、1 1 C 8の場合の結果を示す。M 1はアポトーシスの比率(%)を示し、1 2. 1 6%である。

20 図12 Aは、K M - 1 0 2とH L - 6 0細胞との共培養系でのアポトーシスの解析(T U N E L法)であり、対照として9 C 5の培養上清を用いた結果を示す白黒顕微鏡写真である。ここで、アポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は1 0 0倍である。

25 図12 Bは、K M - 1 0 2とH L - 6 0細胞との共培養系でのアポトーシスの解析(T U N E L法)であり、対照として9 C 5の培養上清を用いた結果を示すカラー顕微鏡写真である。ここで、アポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は1 0 0倍である。

図13Aは、KM-102とHL-60細胞との共培養系でのアポトーシスの解析（TUNEL法）であり、11C8の培養上清を用いた結果を示す白黒顕微鏡写真である。TUNEL陽性細胞が図12より多数認められる。ここでアポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は100倍である。

図13Bは、KM-102とHL-60細胞との共培養系でのアポトーシスの解析（TUNEL法）であり、11C8の培養上清を用いた結果を示すカラー顕微鏡写真である。TUNEL陽性細胞が図12より多数認められる。ここでアポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は100倍である。

図14は、ハイブリドーマ株7D2-E3および11C8より精製されたIgGをSDS・PAGEにより解析した結果を示す電気泳動写真である。分子量マーカー（M、M'）、非還元条件でのマウスIgG（標品）（1）、7D2-E3（2）、11C8（3）、還元条件でのマウスIgG（標品）（4）、7D2-E3（5）、11C8（6）を示す。

図15は、HL-60細胞を用い、CD47の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

図16は、Jurkat細胞を用い、CD47の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

図17は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞（L1210-hIAP）を用いた（72時間インキュベーション）アポトーシス惹起作用を示すためのコントロールとして、mIgG（10 μ g/ml）の結果を示す。

図18は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞を用いた（72時間インキュベーション）、MABL-1（10 μ g/ml）のアポトーシス惹起作用を示す。

図19は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞を用いた（72時間

インキュベーション)、MABL-2 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) のアポトーシス惹起作用を示す。

図20は、Jurkat細胞を用いた(48時間インキュベーション)、アポトーシス惹起作用を示すためのコントロールとして、mIgG ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) の結果を示す。

図21は、Jurkat細胞を用いた(48時間インキュベーション)、MABL-1 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) のアポトーシス惹起作用を示す。

図22は、Jurkat細胞を用いた(48時間インキュベーション)、MABL-2 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) のアポトーシス惹起作用を示す。

図23は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞(L1210-hIAP)を用いた(72時間インキュベーション)アポトーシス惹起作用を示すためのコントロールとして、mIgG ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) の結果を示す。

図24は、Fab化したMABL-2 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) について、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞に対するアポトーシス惹起作用を示す。

図25は、Fab化したMABL-2抗体のSDS電気泳動写真を示す。

図26は、MABL-2で処置した場合に生存期間が顕著に延長したことを示す。

図27は、実施例5(2)におけるELISAの結果を示す。

図28は、F(ab')₂化したMABL-2を処置した場合に生存期間が顕著に延長したことを示す。

図29は、F(ab')₂化したMABL-1抗体、及びMABL-2抗体のSDS電気泳動写真を示す。

図30は、MABL-1およびMABL-2を処置した群において、血中ヒトIgG濃度について見られる顕著な抑制、殺腫瘍効果を示す。

発明を実施するための最良の形態
モノクローナル抗体の作製

本発明のモノクローナル抗体は、一般的には次のようにして作製することができる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、例えば、ヒト Integrin Associated Protein を感作抗原とし、当該抗原を通常公知の免疫法を応用して免疫し、通常公知の細胞融合法を応用して細胞融合させ、
5 通常公知のクローン化法を応用してクローン化することにより可能である。

本発明のモノクローナル抗体の作製方法には、より具体的には、例えば、前記感作抗原として、ヒト Integrin Associated Protein をマウス白血病細胞株 L 1 2 1 0 細胞に発現させた組み換え体細胞を使用し、当該感作抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）を、マウス等の哺乳動物のミエローマ細胞と融合させ、得られた融合細胞（ハイブリドーマ）をクローン化し、その中から前記細胞株を認識する本発明の抗体を産生するクローンを選別し、これを培養して目的とする抗体を回収する方法が好適なものとして例示される。

なお、本発明においては、上記方法はあくまで一例に過ぎず、例えば、この場合、前記感作抗原としては、前記 L 1 2 1 0 組み換え体細胞に限らず、ヒト Integrin Associated Protein (IAP) そのもの、あるいは可溶化型のヒト IAP を使用することも適宜可能であり、前記 L 1 2 1 0 組み換え体細胞の場合と同様にして、目的とする有核血液細胞（骨髄系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体を作製することが可能である。

また、当該抗体の cDNA ライブラリーからファージ・ディスプレイ法を用いて目的とするモノクローナル抗体を作製することも可能である。

このようなモノクローナル抗体の作製方法において、前記感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性などを考慮して選択するのが好ましく、一般的には、マウス、ラット、ハムスター等が好適なものとして使用される。

また、免疫は、一般的方法により、例えば、前記ヒト Integrin Associated Protein を発現する L1210 組み換え体細胞等を哺乳動物に腹腔内注射等により投与することに好ましく実施可能である。より具体的には、PBS や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを、動物に 10 日毎に数回投与することが好ましい。免疫細胞としては、前記細胞株の最終投与後に摘出した脾細胞を使用するのが好ましい。

次に、前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞としては、すでに公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3X63Ag8.653) [J. Immunol., 123, 1548 (1978)]、P3-U1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)]、NS-1 [Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)]、MPC-11 [Cell, 8, 405-415 (1976)]、Sp2/0-Ag14 [Nature, 276, 269-270 (1978)]、FO [J. Immunol. Meth., 35, 1-21 (1980)]、S194 [J. Exp. Med., 148, 313-323 (1978)]、および R210 [Nature, 277, 131-133 (1979)] 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には通常の方法、例えば、ミルシュタインら (Milstein et al.) の方法 [Methods Enzymol., 73, 3-46 (1981)] 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば、融合促進剤の存在下に通常の栄養培地中で実施される。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に、所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を適宜添加使用することもできる。免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に

対して、免疫細胞を1～10倍程度とするのが好ましい。また、前記細胞融合に用いる培地としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI-1640培地、MEM培地、その他、この種の細胞培養に使用される通常の培地が使用可能であり、更に、牛胎児血清(FBS)等の血清補液を併用することも可能である。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培地内でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1,000～6,000程度のPEGを、通常、培地に約30～60%(W/V)の濃度で添加し、混合することによって行われる。続いて、適当な培地を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことにより目的とするハイブリドーマが形成される。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培地、例えば、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地)で培養することにより選択される。当該HAT培地による培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞)が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続する。次いで、通常の限界希釈法に従って、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローン化が実施される。

このようにして作製される本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマから本発明のモノクローナル抗体を採取するには、当該ハイブリドーマを常法に従って培養し、その培養上清から得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水から得る方法など適宜の方法が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適した方法であり、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適した方法である。

更に、前記した方法により得られる抗体は、塩析法、ゲル濾過法、アフィニテ

イークロマトグラフィー等の通常の精製手段を応用して高純度に精製することができる。

モノクローナル抗体断片

5 本発明に係るモノクローナル抗体は、上記説明した抗体の全部でもまた、その一部であってもよい。すなわち、本発明に係るモノクローナル抗体の一部であつて、さらには、ヒトIntegrin Associated Proteinを特異的に認識するものであり、また、ヒトIntegrin Associated Proteinを有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）に
10 アポトーシスを惹起するものであればよい。係る断片は例えば、Fab、F（ab'）₂、Fab' が挙げられる。さらに、係る断片の作製はパパイン、ペプシン、フィシン等の酵素消化により可能である。得られた断片の特性は上記説明した同様の方法で確認可能である。

モノクローナル抗体と同様の作用を有するペプチドおよび低分子化合物

15 上記モノクローナル抗体は、ヒトIntegrin Associated Proteinを認識し、有核血液細胞にアポトーシスを誘起するが、同様にIAPを認識し、有核血液細胞にアポトーシスを誘起するペプチドおよび低分子化合物も包含するものである。

本発明のモノクローナル抗体の特性

20 本発明のモノクローナル抗体は、後記する実施例において具体的に示されるように、ヒトIntegrin Associated Proteinを特異的に認識するものである。

25 さらに、本発明のモノクローナル抗体はヒトIntegrin Associated Proteinを有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）

にアポトーシスを惹起するものである。

また、係る特性を利用することにより、骨髓性白血病およびリンパ性白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

すなわち、本発明のモノクローナル抗体を利用して有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす抗原等を特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するための、あるいは、当該モノクローナル抗体の固有の特性を利用して骨髓性白血病およびリンパ性白血病治療薬剤等として使用するための具体的システムの構築、その改変および応用等は、当業者にとって自明の通常の方法を応用して実施されるものである限り、いずれも本発明の範囲に含まれるものであることは云うまでもない。

抗白血病治療剤

本発明に係る抗白血病治療剤は、IAPの作用が本発明に係る抗体等の結合により亢進することに基づくものである。また、本発明に係る抗体の投与量については特に制限はないが、 $5\mu\text{g}-500\text{mg/kg}$ の範囲であることが好ましい。

実施例

次に、本発明を実施例に基づいて更に具体的に説明するが、本発明は当該実施例に限定されるものではない。

実施例1（モノクローナル抗体の作製）

（1）感作抗原と免疫法

感作抗原として、DBAマウス由来の白血病細胞株L1210細胞（ATCC株番号CCL-219, J. Natl. Cancer Inst. 10:179-192, 1949）にヒトIntegrin Associated Protein（IAP）を高発現した細胞株を用いて抗原感作を行った。

ヒトIAPの遺伝子は、HL-60細胞株のmRNA（CLONTECH社製）より作製したcDNAを鋳型としてヒトIAP特異的な塩基配列を持つプラ

イマー（センス・プライマーとしては、GCAAGCTTATGTGGCCCC
TGGTAGCGを、アンチセンス・プライマーとしては、GCGGCCGCT
CAGTTATTCTAGGAGGを使用した。）を用いたPCRによりヒトI
-APを増幅した（図1）。

5 このPCR産物をクローニングベクターpGEM-T vector（プロメ
ガ社製）に組み込み大腸菌JM109（タカラ社製）にトランスフォーメーショ
ンし、Insert DNAの塩基配列をDNAシーケンサー（373A DN
A sequencer, ABI社製）にて確認後、発現ベクターpCOS1に
組み換えた。

10 発現ベクターpCOS1は、pEF-BOS (Nucleic Acids
Research, 18, 5322, 1990) のデリバティブであり、ヒトエ
ロンゲーション・ファクター-1 α をプロモーター／エンハンサーとして使用し
ネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだベクターである。このヒトIAPを組み込
んだ発現ベクターをL1210細胞株にDMRIE-C(GIBCO-BRL社製)を用いて遺
15 伝子導入しGeneticin（最終濃度1mg/ml, GIBCO-BRL社製）により選
択し、さらに、遺伝子が導入されたL1210細胞は限界希釈法により細胞をク
ローニングした。

得られたクローンについて、ヒトIAPを認識する抗CD47抗体（ファーマ
ンジェン社製）で抗原の発現を検討し、発現量の高いクローンを抗原感作の細胞
20 として選択した（図2, 3）。この組み換え体L1210細胞の培養条件は、1
0%牛胎児血清（FBS、Moredgate社製）、Iscove改変Dulb
ecco培地（IMDM）（GIBCO-BRL社製）を培地として使用し、
5%CO₂インキュベーター中で37°Cの温度条件下で継代培養を行った。

免疫動物としては、L1210細胞と同系マウスであるDBA/2マウス（日
25 本チャールズリバー繁殖）を使用した。抗原感作に使用したヒトIntegrin
Associated Protein (IAP) を遺伝子導入したL12

10細胞は、マイトマイシン-C（協和発酵社製） $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で約30分インキュベーションし細胞の増殖を止めた後、マイトマイシン-Cを完全に洗浄し、PBSに懸濁した。

5 この細胞を約 5×10^6 個の細胞数で約10日前後の間隔で3回上記のマウス腹腔内に注射し免疫した。3回免疫後に眼窩より血液を採取しその血清を1%BSA含有PBSで50倍希釈し、この血清希釈液と抗原感作に用いた組み換え体L1210細胞との結合性をFACSscan（ベクトン・ディッキンソン社製）により確認し（図4）、活性の最も高い個体について、4回目の免疫のさらに5日後に約 1×10^7 個細胞を腹腔内に投与し追加免疫を行った。最終免疫4日後
10 にマウスを屠殺して脾臓を摘出した。

（2）細胞融合

上記のマウスから摘出した脾臓を細切後、遊離した脾細胞を遠沈した後、IMDM培地中に懸濁し、浮遊させ、十分に洗浄を行った。一方、マウス・ミエローマ細胞株P3-U1〔Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)〕
15 を、10%牛胎児血清（FBS、Moregate社製）を含有するIMDM培地にて培養し、同様に前記IMDM培地で洗浄後、その 1×10^7 個と、前記脾細胞 5×10^7 個とを遠心管に入れ混合し、ポリエチレングリコール4000（半井化学社製）によって常法〔Clin. Exp. Immunol., 42, 458-462 (1980)〕に従い細胞融合させた。
20

次いで、得られた融合細胞を、10%FBSおよび融合細胞の増殖刺激剤（BM-Condimed H1, ベーリンガー・マンハイム社製）を含むIMDM培地にて懸濁し96個のウェルプレートに分注し、5%CO₂インキュベーター中で37℃で培養した。翌日にHAT選択培地および増殖刺激剤を含む10%FBS・IMDM培地に置換して培養を継続し、増殖維持させた。
25

次に、このようにして得られた融合細胞についてその培養上清の機能を白血病

細胞株を用いて検討するため、融合細胞の培地を 10%FBS を含む IMDM 培地に代え、培養を継続し増殖維持させた。

(3) スクリーニング

上記の融合細胞の培養上清を用いて以下のスクリーニングを行った。

5 ① 一次スクリーニング

ヒト Integrin Associated Protein (IAP) の遺伝子を遺伝子導入したマウス脾臓間質細胞株 (CF-1 細胞) (抗原感作に用いたヒト IAP を発現する L1210 細胞を作製する際使用したプラスミドと同一のプラスミドを遺伝子導入し組み換え体細胞とした) を 96 ウェルプレートに 1×10^4 /ウェルで播種し終夜で培養し、その後 2% PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde) により固定し ELISA 用プレートを作製した。このプレートは、洗浄後 1% BSA 溶液にて室温で 1 時間ブロッキングし、さらに洗浄後各種ハイブリドーマの培養上清を 50 μ l 添加し室温で 1 時間インキュベーションした。

15 洗浄後、アルカリフォスファターゼでラベルした抗マウス IgG+A+M (H+L) (ザイメッド社製) を添加し室温で 1 時間インキュベーションし、洗浄後 SIGMA 104 substrate (シグマ社製) を最終濃度 1mg/ml で添加し室温でインキュベーションし、比活性をマイクロプレート・リーダー (Model 3550, バイオラッド社製) で測定した。

20 その結果、ハイブリドーマを 2880 ウェルに播種しその内 2089 ウェルにハイブリドーマの出現を確認し 187 ウェルが一次スクリーニングで陽性であった。なお、陰性対照としては、マウス IgG1 を、陽性対照としては抗ヒト CD47 抗体 (ファーミンジェン社製) をそれぞれ、3 μ g/ml 濃度で 50 μ l 添加し室温で 1 時間インキュベーションした。

② 二次スクリーニング

25 一次スクリーニングで陽性と判定したクローンについて、発現ベクター pCOS1 のみを遺伝子導入した CF-1 細胞を対照として、ヒト Integrin A

associated Protein (IAP) を発現する CF-1 細胞を用いての ELISA 系を行うことで、ハイブリドーマが産生する抗体がヒト IAP を特異的に認識するか否かをスクリーニングした。

その結果、一次スクリーニングで陽性と認められた 187 ウェルの内 21 ウェルについて陽性が認められた。これらのうち、7D2 および 11C8 を代表例として、ヒト IAP との特異的結合を ELISA の吸高度で表 1 に示した。

(表 1) ハイブリドーマ培養上清のヒト IAP に対する特異的結合の ELISA での解析

=====

10	<Raw data>	PBS	α hCD47	7D2	11C8
			3 μ g/ml		
	CF1-pCOS1	0.185	0.160	0.189	0.149
	CF1-hIAP-55-8	0.192	0.456	0.568	0.812

15	<Subtracted>	PBS	α hCD47	7D2	11C8
			3 μ g/ml		

	Specific binding	0.007	0.296	0.379	0.663
--	------------------	-------	-------	-------	-------

=====

20 ③ 三次スクリーニング

二次スクリーニングで陽性と判定したクローンについて、Jurkat 細胞 (ヒト T 細胞リンフォーマ株) および ARH 77 細胞 (ヒトミエローマ細胞株) を用いて増殖抑制実験を行った。Jurkat 細胞は 5×10^3 /ウェルで、ARH 77 細胞は 1×10^4 /ウェルの細胞数で 96 ウェルプレートに 100 μ l で播種し、この細胞の浮遊液に上記のハイブリドーマ・クローンの培養上清を 5 ないし 10 μ l 添加し、約 2 日間培養後 MTS により細胞数を測定した。対照として

は、10%FBSを含むIMDM培地および一次スクリーニングで陰性であったクローン(8G2および9C5)の培養上清をそれぞれ5または10 μ lずつ添加した。

その結果は、11C8、7D2-E3(7D2のサブ・クローン)、13F1、2F12の4クローンを代表例として増殖抑制効果を図5, 6に示した。

5 (4) 抗体の特性

① 11C8, 7D2-E3, 13F1, 2F12の培養上清について、イムノグロブリンのタイプをELISA系を用いて検討した。

すなわち、ヒトIntegrin Associated Protein (IAP)を発現するCF-1細胞を96ウェルプレートに播種しELISAプレートを作製し上記の培養上清を50 μ l添加し、二次抗体としてはアルカリフォスファターゼでラベルした抗マウスIgG抗体(ザイメッド社製)および抗マウスIgM抗体(バイオソース社製)を反応させ、マイクロプレート・リーダーで測定した。その結果、11C8, 7D2-E3はIgGであり、13F1, 2F12はIgMであった。

15 ② 上記の4クローンの内11C8, 7D2-E3の2クローンについて、DNAの断片化をフローサイトメトリー(FACScan, ベクトン・ディッキンソン社製)でJurkat細胞、HL-60細胞を用い解析した。Jurkat細胞を用いては11C8および7D2-E3について、HL-60細胞を用いては11C8について検討した。

20 12ウェルのプレートに、Jurkat細胞およびHL-60細胞をそれぞれ 4×10^4 /ウェル/2mlで播種し、7D2-E3および11C8の培養上清を200 μ lを添加し2日間培養後、測定に供した。対照としては、8G2の培養上清を同等量添加した。細胞を培養プレートより回収し200xgで細胞ペレットを2mlの冷70%エタノール中に4℃で60分間固定した。次いで、細胞を遠心し、
25 1mlのPBSで洗浄後、0.5mlのPBSで再懸濁した。この0.5mlの細胞サンプルに対して0.5mlのRNase (Type I-A, Sigma, St. Lo

uis, MO, USA, 1mg/ml in PBS) を加え、次いで、1ml のヨウ化プロピジウム (PI, Sigma, 100 μ g/ml in PBS) 溶液に混合した。混合した細胞は暗所で 37°C で 60 分間インキュベーションした後、4°C の暗所に保持し、フローサイトメトリーによる測定に供した。

5 その結果、図 7～9, 10～11 に示す様に、7D2-E3 および 11C8 の培養上清は、Jurkat 細胞に、11C8 の培養上清は HL-60 細胞に対しアポトーシスを起こしている細胞の比率を上昇させることが認められた。

③ 上記の 11C8 の培養上清について、ヒト骨髓間質細胞株 KM102 細胞フィーダーレイヤーとして HL-60 細胞との共培養系で、これらの培養上清が HL-60 細胞にアポトーシスを起こすか否かを検討した。

すなわち、2 ウェルの Lab-Tek Chamber Slide (ナルジェ ムンク インターナショナル社製) に KM102 細胞を播種し sub-confluent の状態にし、この上に 1×10^4 個の HL-60 細胞を播種し約 1 日培養し、その後接着していない HL-60 細胞を除去し同時に上記の培養上清を最終濃度で 10% となるように添加し 2 日間培養した。培養後、細胞を 10% ホルマリンで固定し、TUNEL 法 (ApopTag Plus (Onco r 社製)) によりアポトーシスを起こしている HL-60 細胞を検出した。その結果、図 12, 13 に示す様に 11C8 の培養上清では、対照のヒト IAP と反応しないハイブリドーマクローンの培養上清 9C5 に比べアポトーシスになっている HL-60 細胞の数は増加していることが観察された。

(5) 抗体の精製

ハイブリドーマが産生する抗体の精製については、上記のハイブリドーマ株のうち、IgG を産生する 7D2-E3 および 11C8 のクローンの細胞株を、常法に従いプリスタン投与を施行した BALB/c/AnNCrj マウス (♂, 日本チャールズリバー社製) に腹腔内注入した。数週間後、産生された腹水を採取し産生される抗体を常法により分離し精製した。すなわち、得られた腹水はポロ

ス プロテイン A プラスチックカラム（パーセプティブ・バイオシステム社製）で精製し、PBS（ダルベッコ社製）で透析し SDS-PAGE によりバンドの確認を行った。図 14 に示すごとく、標品のマウス IgG（カベル社製）を対照として電気泳動を行うと、7D2-E3 および 11C8 のクローンの IgG は、非還元条件、還元条件ともに、標品のマウス IgG と同一の位置にバンドが認められた。

上記の実施例においては、感作抗原として、前記ヒト Integrin Associated Protein (IAP) を発現する L1210 細胞を使用した場合について例示したが、他のヒト IAP を発現する細胞あるいはヒト IAP そのものを使用した場合にも同様にしてモノクローナル抗体を作製すること、さらに、ファージ・ディスプレイ法を用いての抗体ライブラリーからのモノクローナル抗体の作製も可能であり、本発明は前記モノクローナル抗体に限らず、それと同様の特性を有するすべてのモノクローナル抗体、および当該モノクローナル抗体を産生するすべてのハイブリドーマを包含するものである。

さらに、上記のモノクローナル抗体の発明には、ヒト型化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、プライマテイズド抗体、さらに、抗体を各種酵素（パパイン、ペプシン、フィシン等）により消化した抗体の断片を含むものとする。

本発明のモノクローナル抗体の抗ヒト Integrin Associated Protein (IAP) 抗体を産生するハイブリドーマは、DBA系マウス脾細胞とマウス・ミエローマ細胞株 P3-U1 を親細胞として作製された新規な融合細胞であり、公的微生物寄託機関である通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に、1997 年 9 月 1 日、抗 IAP 抗体（マウスハイブリドーマ 11C8-F8（11C8 のサブクローン）、MABL-1 と命名した）、受託番号 FERM BP-6100、抗 IAP 抗体（マウスハイブリドーマ 7D2-E3（7D2 のサブクローン）、MABL-2 と命名した）、受託番号 FERM-BP-6101 として国際寄託

されている。

実施例2 (MABL-1、MABL-2抗体のサブクラス決定)

上で得られたMABL-1、およびMABL-2抗体のサブクラスを決定する
目的で、100ng/ml に調製したMABL-1、およびMABL-2抗体 500 μ l を、
5 ISOTYPING KIT(STRATAGENE 社製) にスポットしたところ、MABL-1はIg
G1、 κ であり、MABL-2はIgG2a、 κ であることが明らかとなった。

実施例3 (ヒトIAPを発現するヒト白血病細胞)

ヒトIAPを認識する抗CD47抗体(市販品を使用した)で各種ヒト白血病
10 細胞株におけるIAPの発現をフローサイトメトリーで検索した。ヒトIAPは
CD47と同一と考えられていることから(Biochem. J., 304, 525-530, 1994)、
上記の抗体を検索に用いた。細胞株としては、Jurkat細胞、HL-60細胞、
K562細胞、ARH77細胞、Raji細胞、CMK細胞を用いた。細胞
は、 2×10^5 /サンプルとし、抗CD47抗体は最終濃度で5 μ g/ml で細胞
15 とインキュベートし、二次抗体はFITC標識した抗マウスIgG抗体(ベクト
ン・ディッキンソン社製)を使用した。また、コントロールとしてはマウスIg
G1抗体(ザイメット社製)を使用した。フローサイトメトリーの結果は、図1
5 (HL-60) 及び図16 (Jurkat) に示され、いずれの細胞株もIAP
を発現していることが明らかとなった。

実施例4 (in vitroでのアポトーシス効果)

(1) ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞、Jurkat細胞、HL-
60細胞を用い、MABL-1およびMABL-2抗体のアポトーシス惹起作用
をAnnexin-V(ベーリンガーマンハイム社製)により検討した。Ann
25 nexin-Vによる解析の結果を図17~22にそれぞれ示した。ここで図の左
下の領域にあるドットは生細胞を、右下の領域はアポトーシス細胞を、右上の領

域は壊死細胞を示す。抗体は対照としてマウスIgG（サイメット社製）、MABL-1およびMABL-2を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で使用し、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞では、 4×10^3 個の細胞で72時間、Jurkat細胞では 6×10^4 個の細胞で48時間インキュベートした後、Annexin-Vにより解析した。その結果、図17～22に示す通り、細胞死が認められた。また、HL-60細胞では、MABL-1を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で使用し、 1×10^5 個の細胞でAnnexin-Vにより解析し、同様に細胞死が認められた。

(2) Fab化したMABL-2抗体について、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞に対するアポトーシス惹起作用を検討した。すなわち、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞を 4×10^3 個で培養し、抗体はFab化したMABL-2およびその対照としてマウスIgGを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で使用し、72時間インキュベートした後、Annexin-Vで測定した。その結果は、著しい細胞死が認められた（図23，図24）。MABL-2抗体のFab化は、抗体をパパイン（ピアス社製）で消化し精製したものを実験に供した。Fab化したMABL-2抗体については、そのSDS電気泳動により確認した（図25）。

実施例5（in vivoでのアポトーシスの検討）

(1) MABL-1およびMABL-2（Whole IgG）による薬効
ヒトIAPを発現するKPMM2細胞（ヒトミエローマ細胞株）をSCIDマウスに移植し、移植後10日目にMABL-1およびMABL-2（Whole IgG）をそれぞれ $5\mu\text{g}/\text{head}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{head}$ （ $n=5$ ）を単回静脈内投与し、KPMM2移植後28日目に血中IgG濃度をELISAにて測定した結果、消失したことが確認された。さらに生存期間についても検討した。その結果、MABL-1およびMABL-2を処置した群では、血中ヒトIgG濃度については顕著な抑制が見られ殺腫瘍効果を示した（図30）。さらに生存期間も顕著に延長したことがわかる（図26）。

(2) M A L B - 1 および M A L B - 2 (F (a b ') 2) による薬効
M A L B - 1 および M A L B - 2 抗体をペプシンにより消化しプロテインAにより精製 (ピアス社製) した F (a b ') 2 を用い、F c 領域を介した細胞障害作用を除外した殺腫瘍効果を検討した。すなわち、ヒト I A P を発現する K P M M
5 2 細胞 (ヒトミエローマ細胞株) を S C I D マウスに移植し、F (a b ') 2 化した M A B L - 1 および M A B L - 2 の 1 0 0 μ g/head 投与群では、移植後 6 日目、10 日目に、10 および 30 μ g/head 投与群では投与後 6、8、10 日目に静脈内投与し、血中 I g G 濃度を移植後 30 日目に E L I S A にて測定した (図 27)。さらに、生存期間についても移植後 90 日まで検討した。その結果、
10 M A B L - 1 および M A B L - 2 を処置した群では、血中ヒト I g G 濃度については顕著な抑制効果が認められ、殺腫瘍効果を示した。さらに生存期間も顕著に延長したことがわかる (図 28)。なお、F (a b ') 2 化した M A B L - 1 抗体、及び M A B L - 2 抗体の S D S 電気泳動写真を図 29 に示す。

産業上の利用可能性

15 本発明のモノクローナル抗体は、ヒト I n t e g r i n A s s o c i a t e d P r o t e i n を特異的に認識する抗体であり、ヒト I n t e g r i n A s s o c i a t e d P r o t e i n を有する有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす抗原である。従って、ヒト I n t e g r i n A s s o c i a t e d P r o t e i n を特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するのに有
20 用であると共に、有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす作用を有することから、当該特性を利用して、骨髓性白血病およびリンパ系白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

請求の範囲

1. Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体。
- 5 2. Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体断片、ペプチド、および低分子化合物。
3. 請求項 1 記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
4. IAP に結合して IAP の作用を亢進させ、有核血液細胞にアポトーシスを誘起する物質を含有する抗白血病治療剤。
- 10 5. 請求項 4 の物質がモノクローナル抗体であることを特徴とする抗白血病治療剤。
6. 請求項 4 の物質がモノクローナル抗体断片、ペプチド、低分子化合物であることを特徴とする抗白血病治療剤。

図 1



図 2

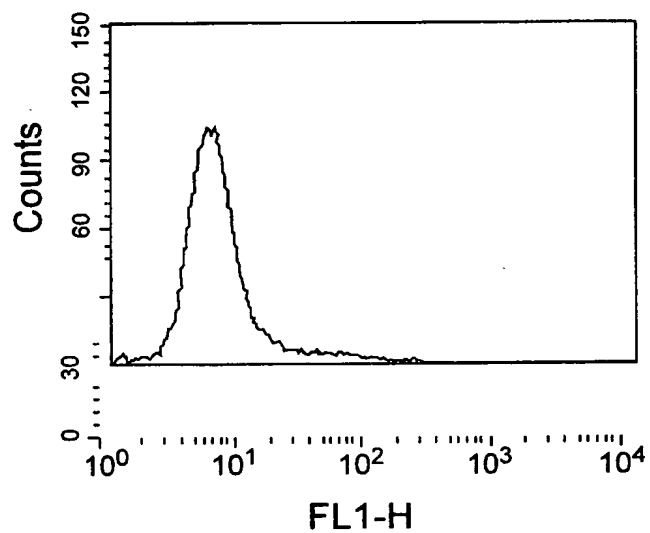


図 3

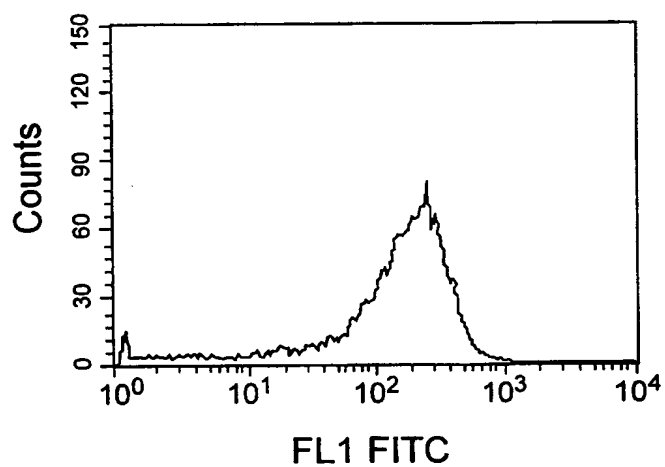


図 4

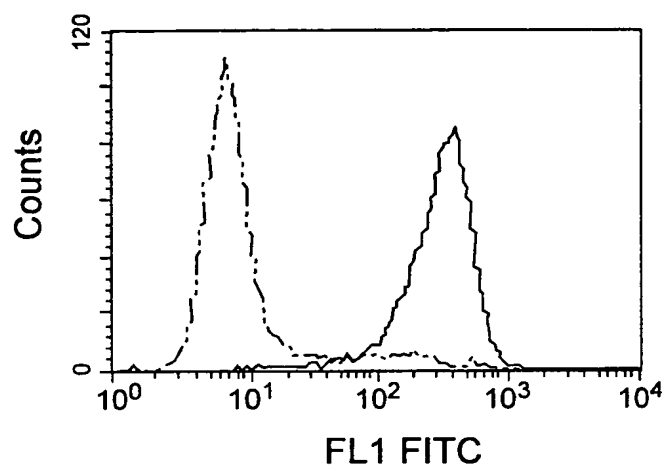


図 5

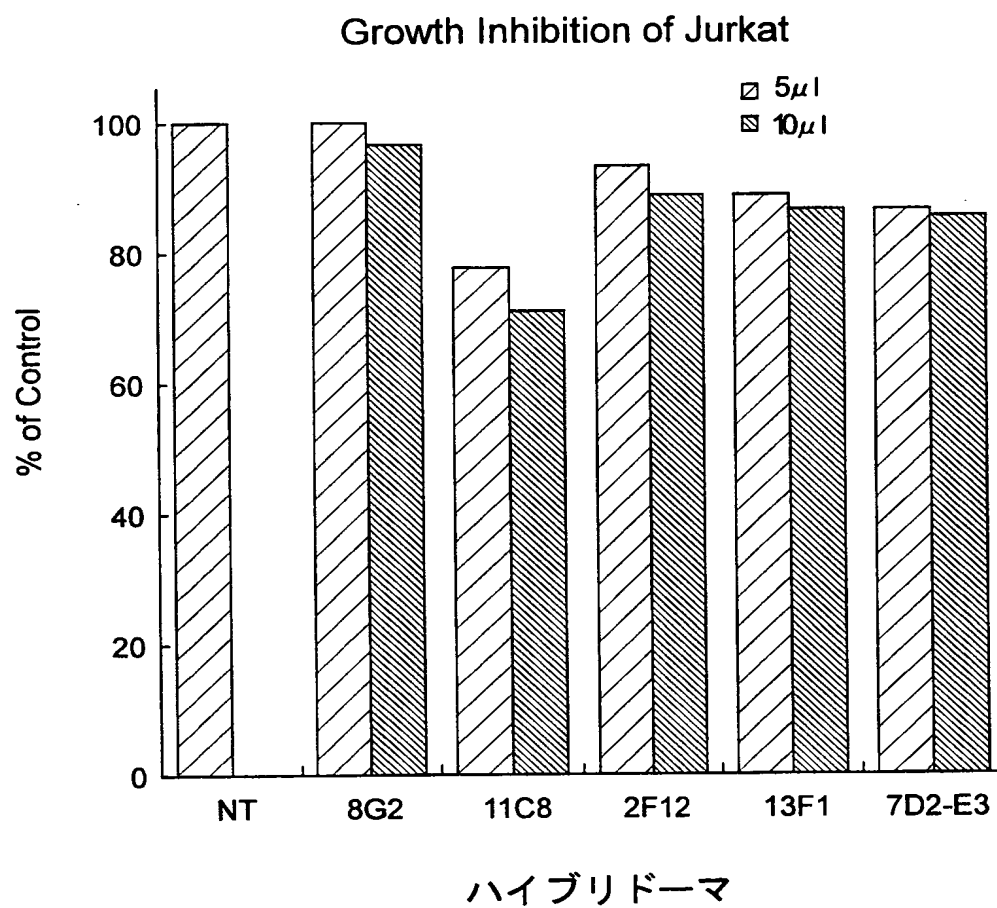


図 6

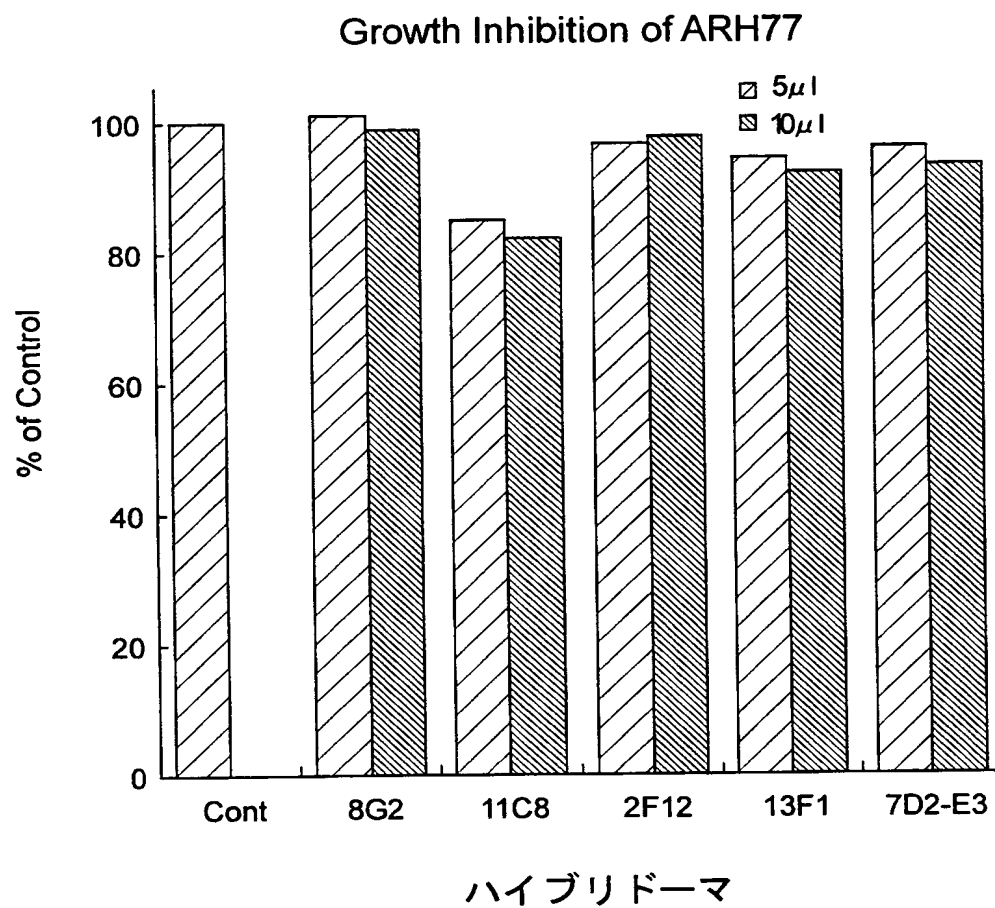


図 7

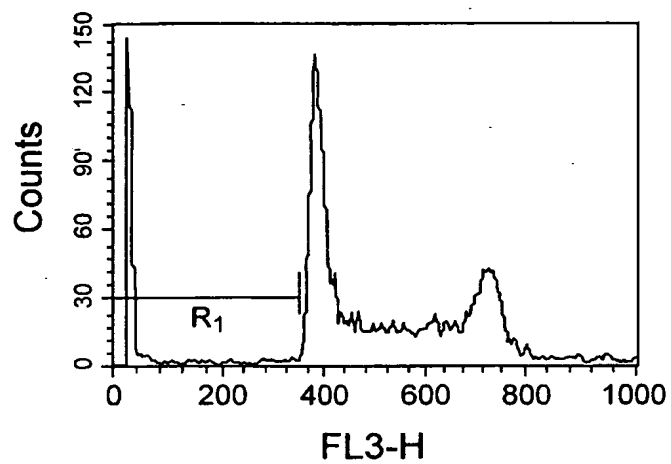


図 8

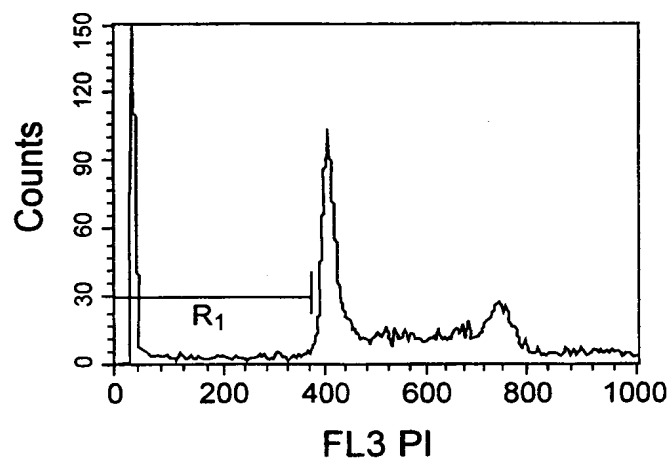


図 9

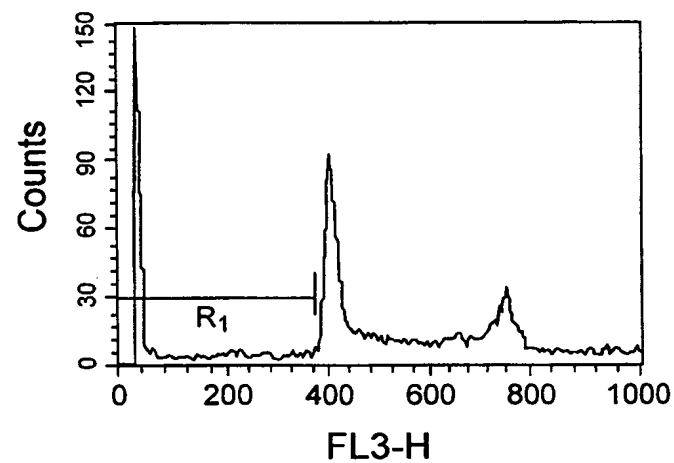


図10

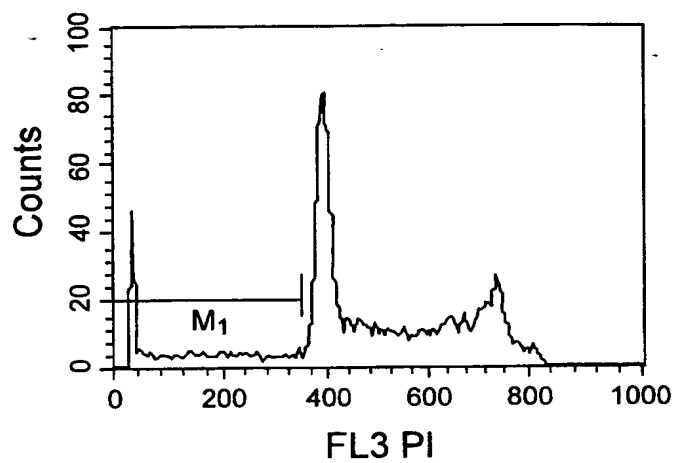


図11

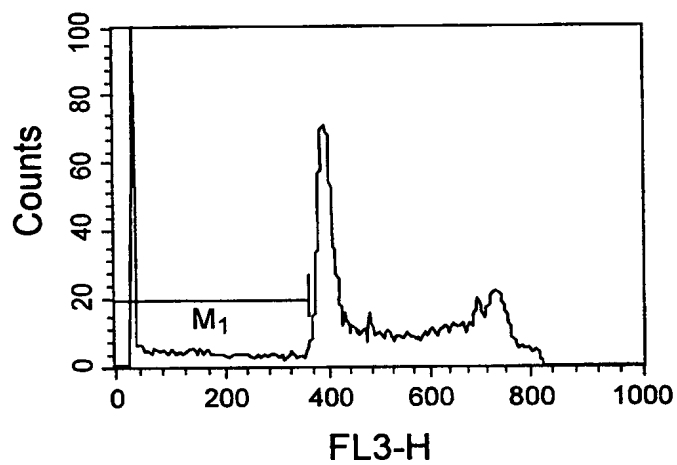


図12A

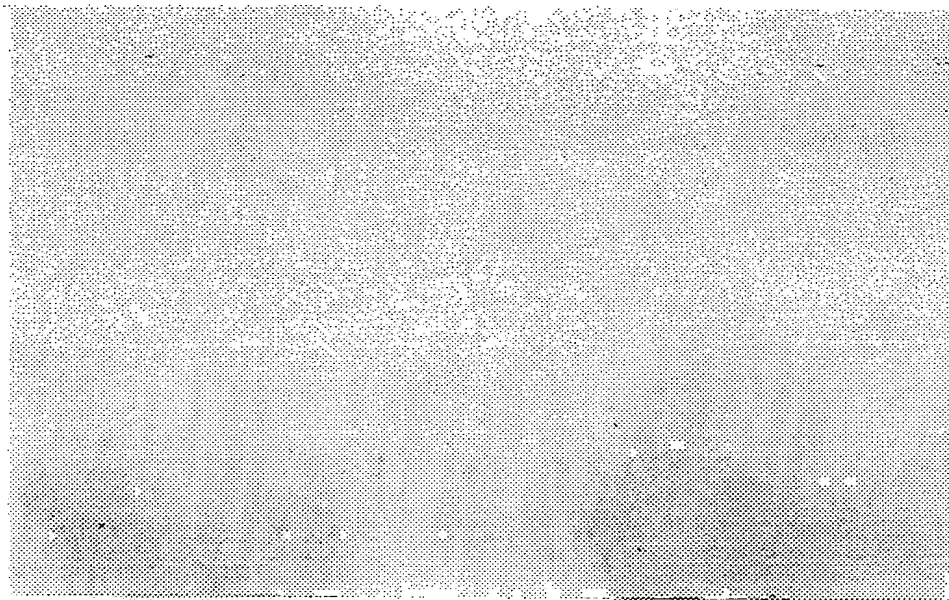


図12B

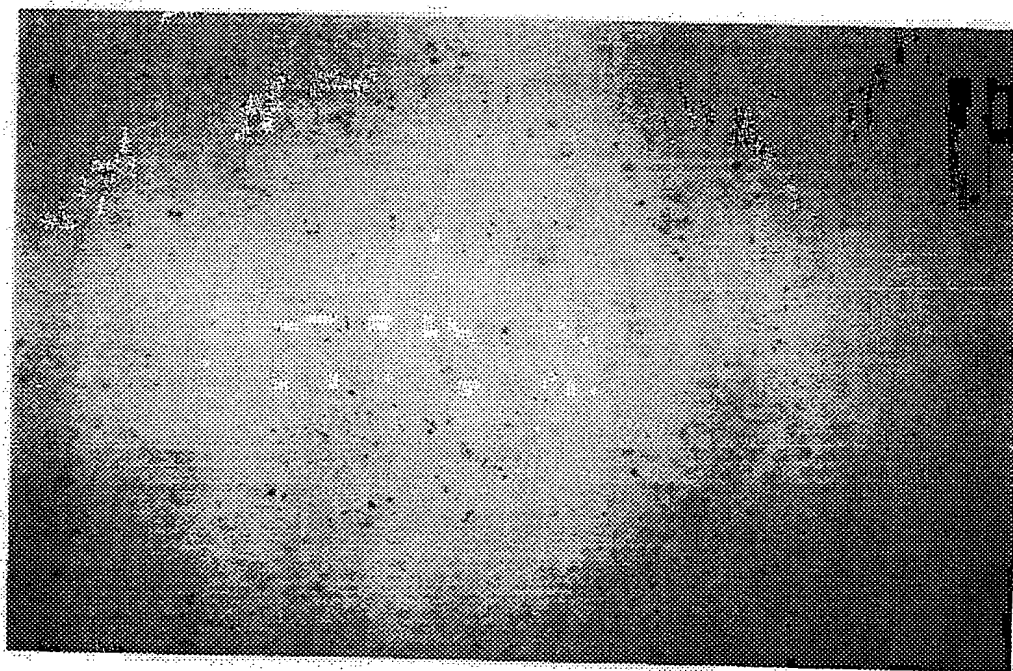


図13A

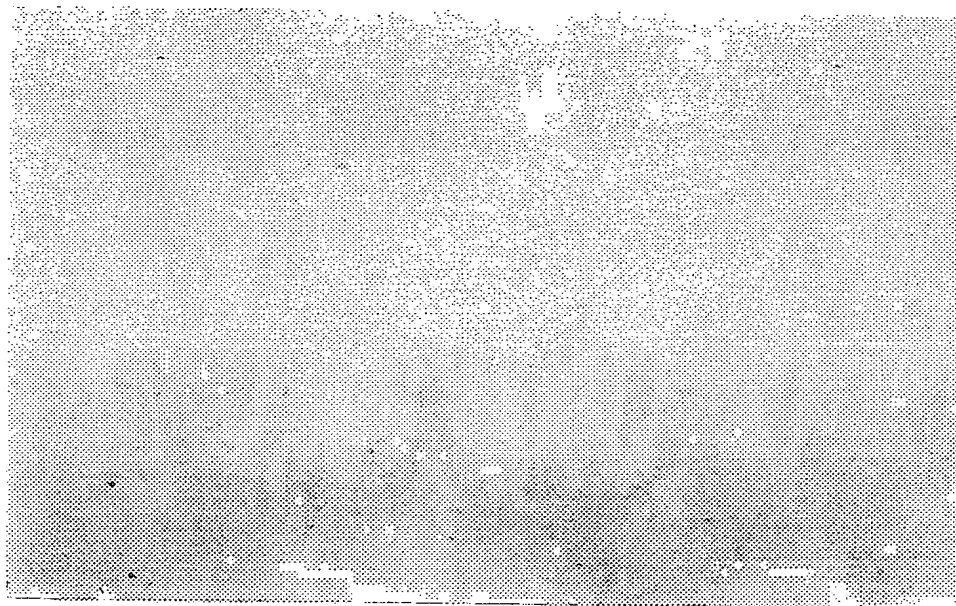


図13B

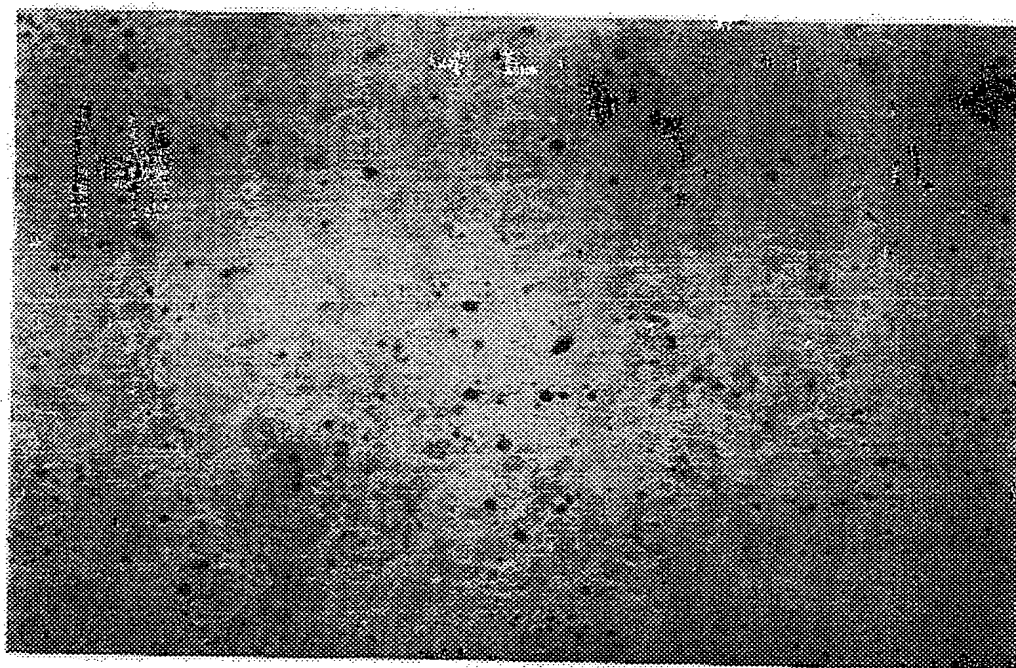


図14

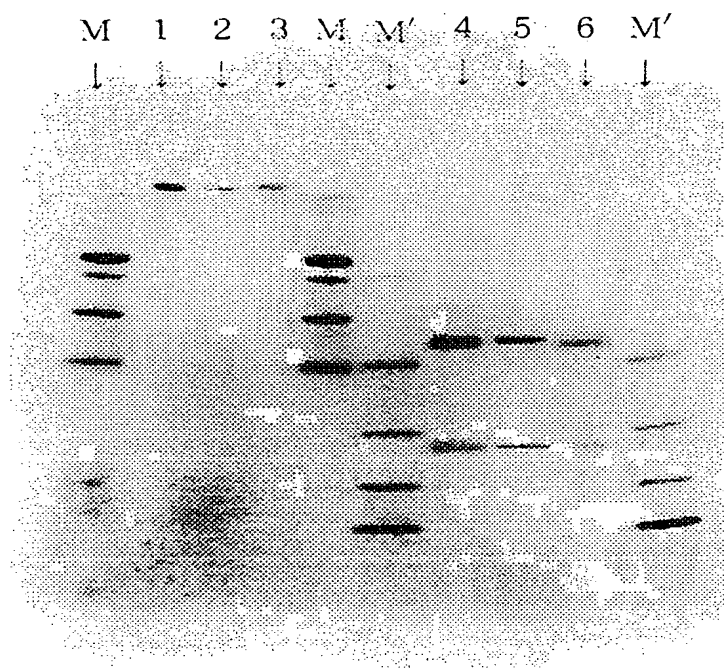


図15

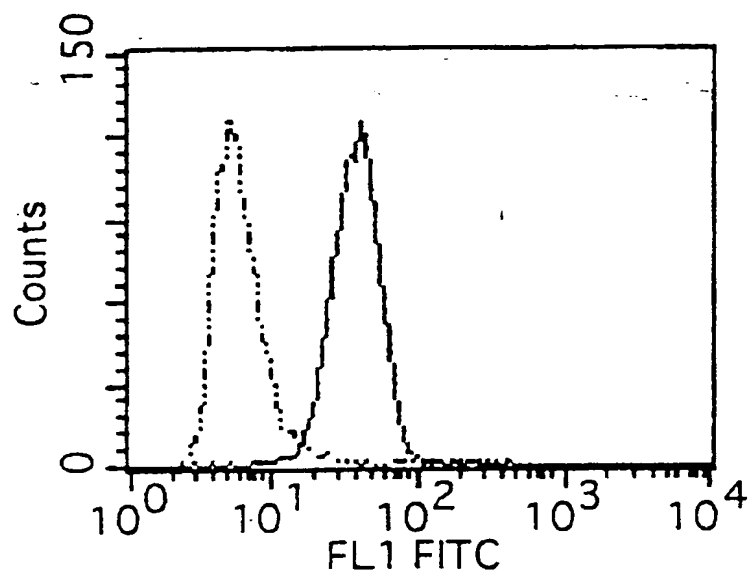


図16

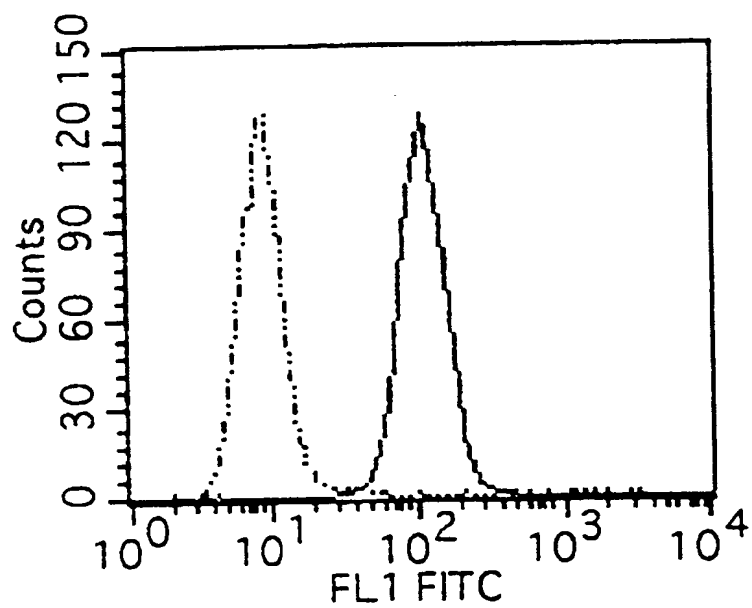


図17

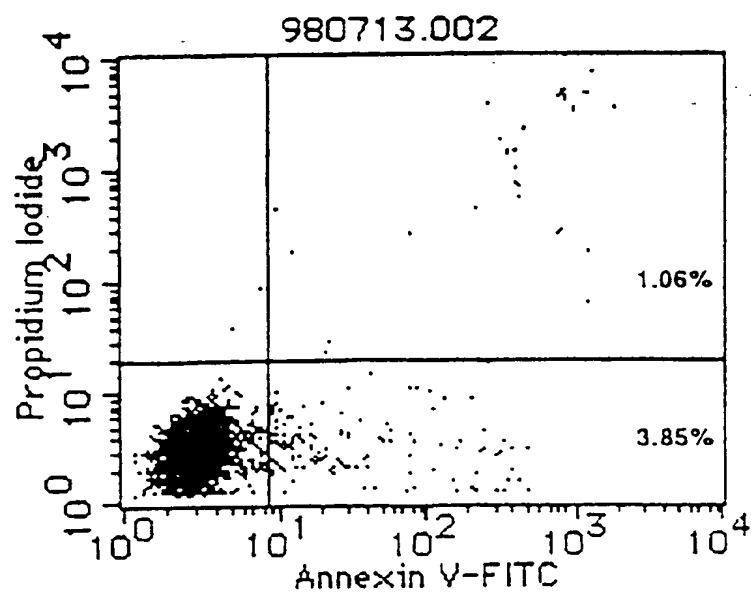


図18

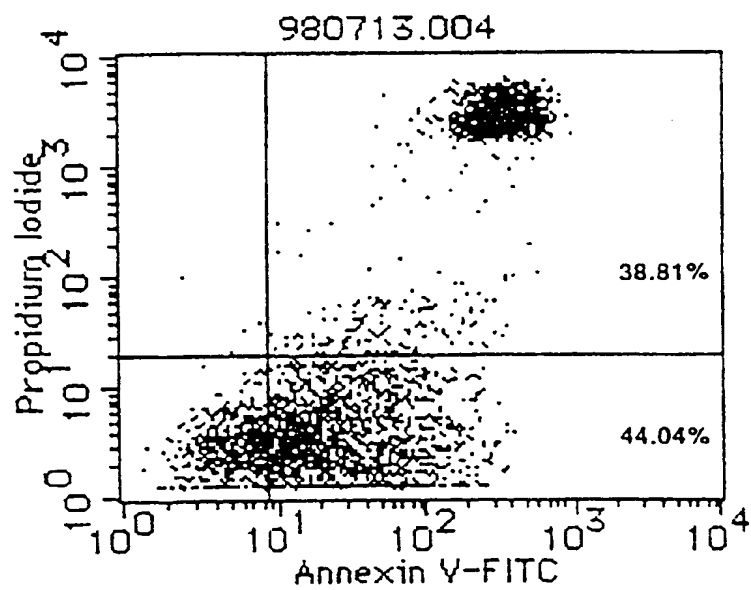


図19

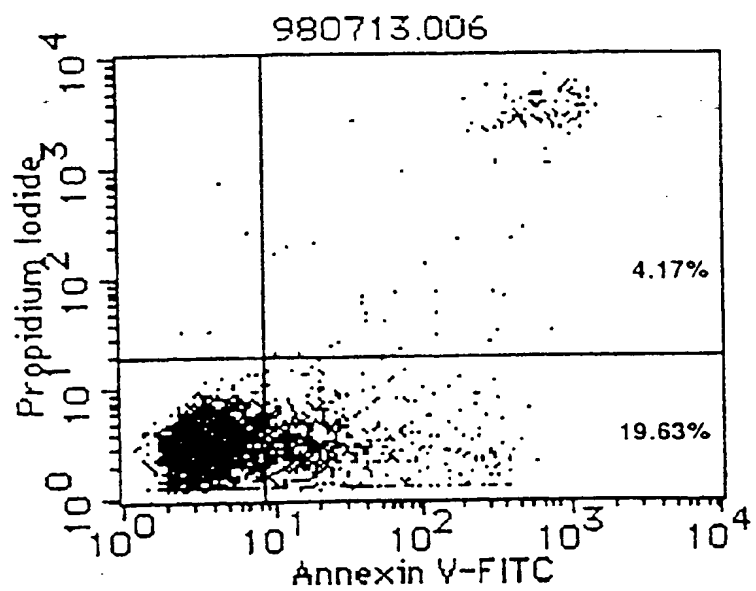


図20

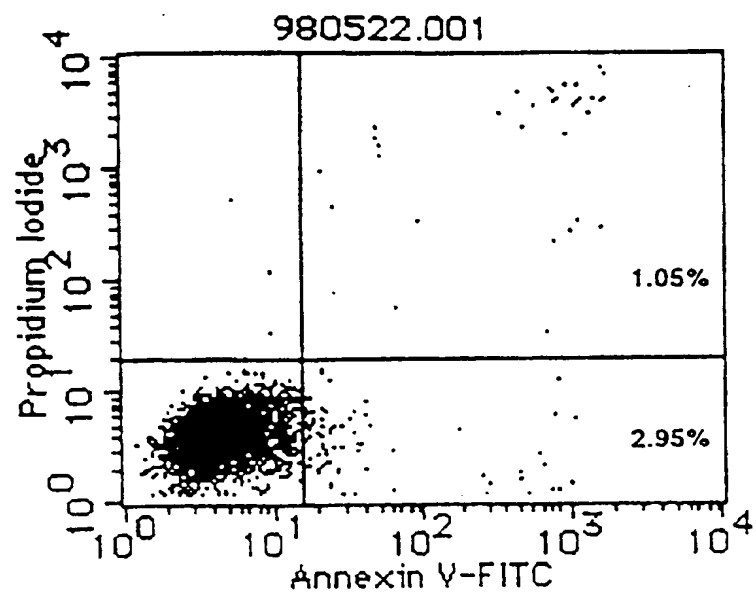


図21

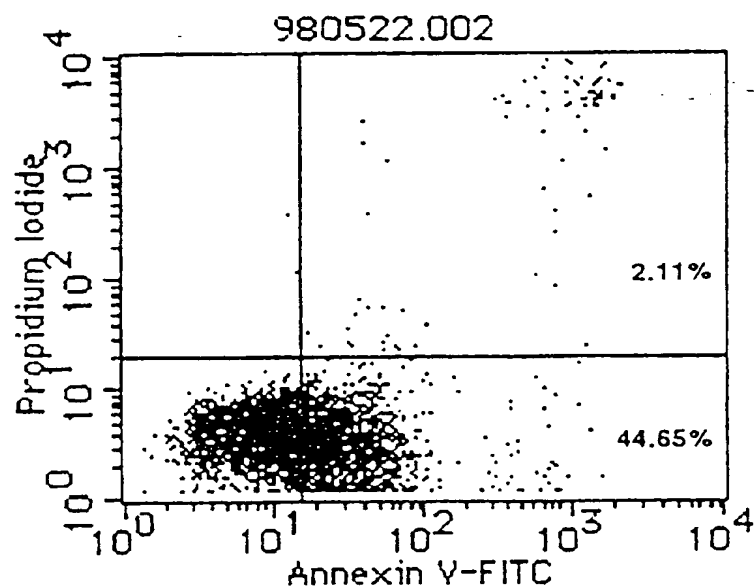


図22

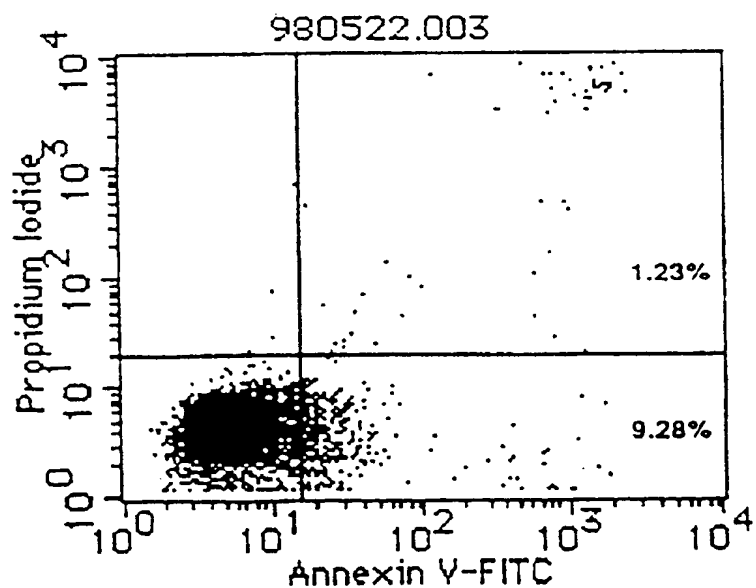


図23

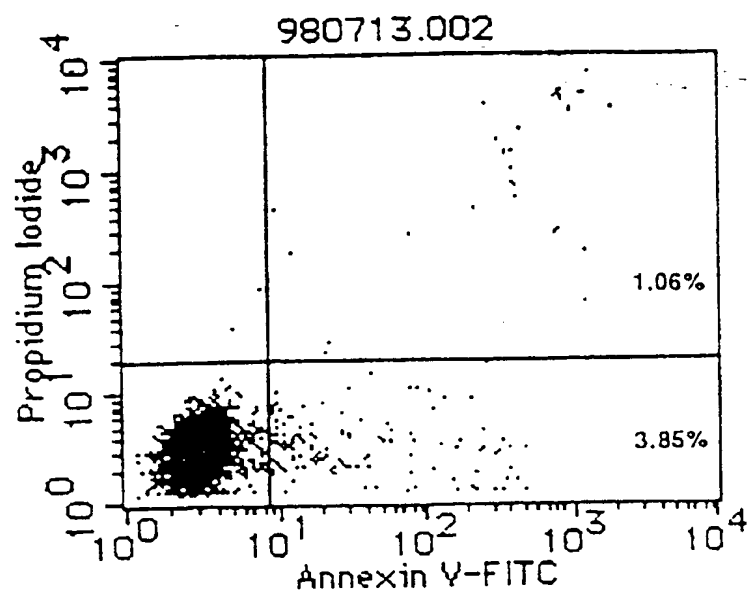


図24

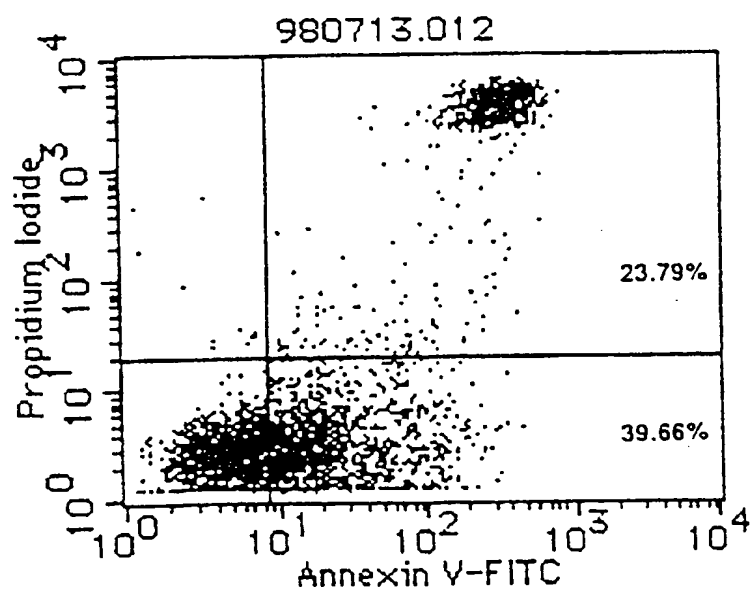
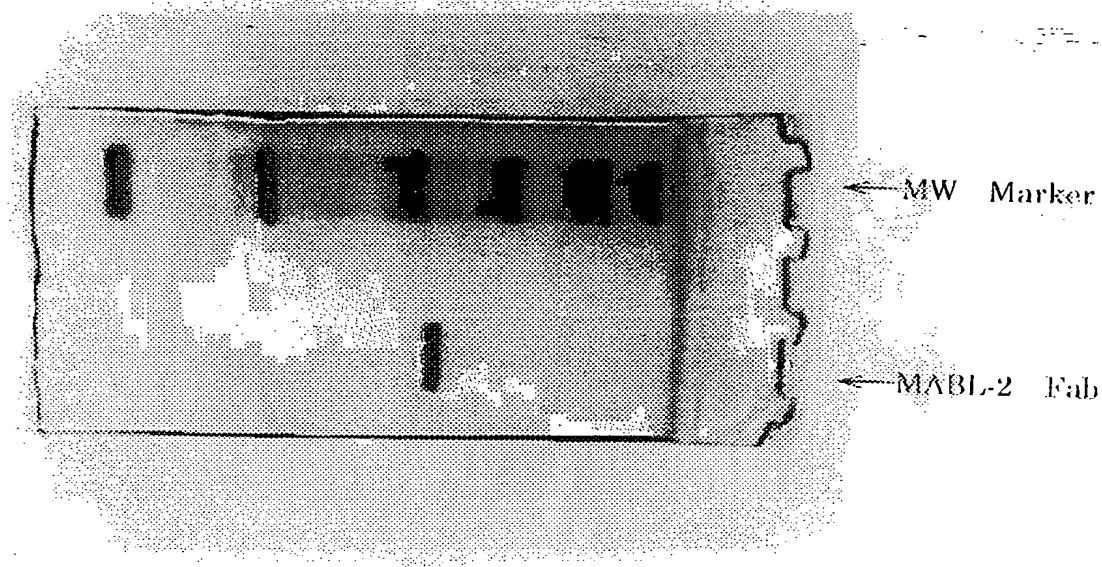


図25



26

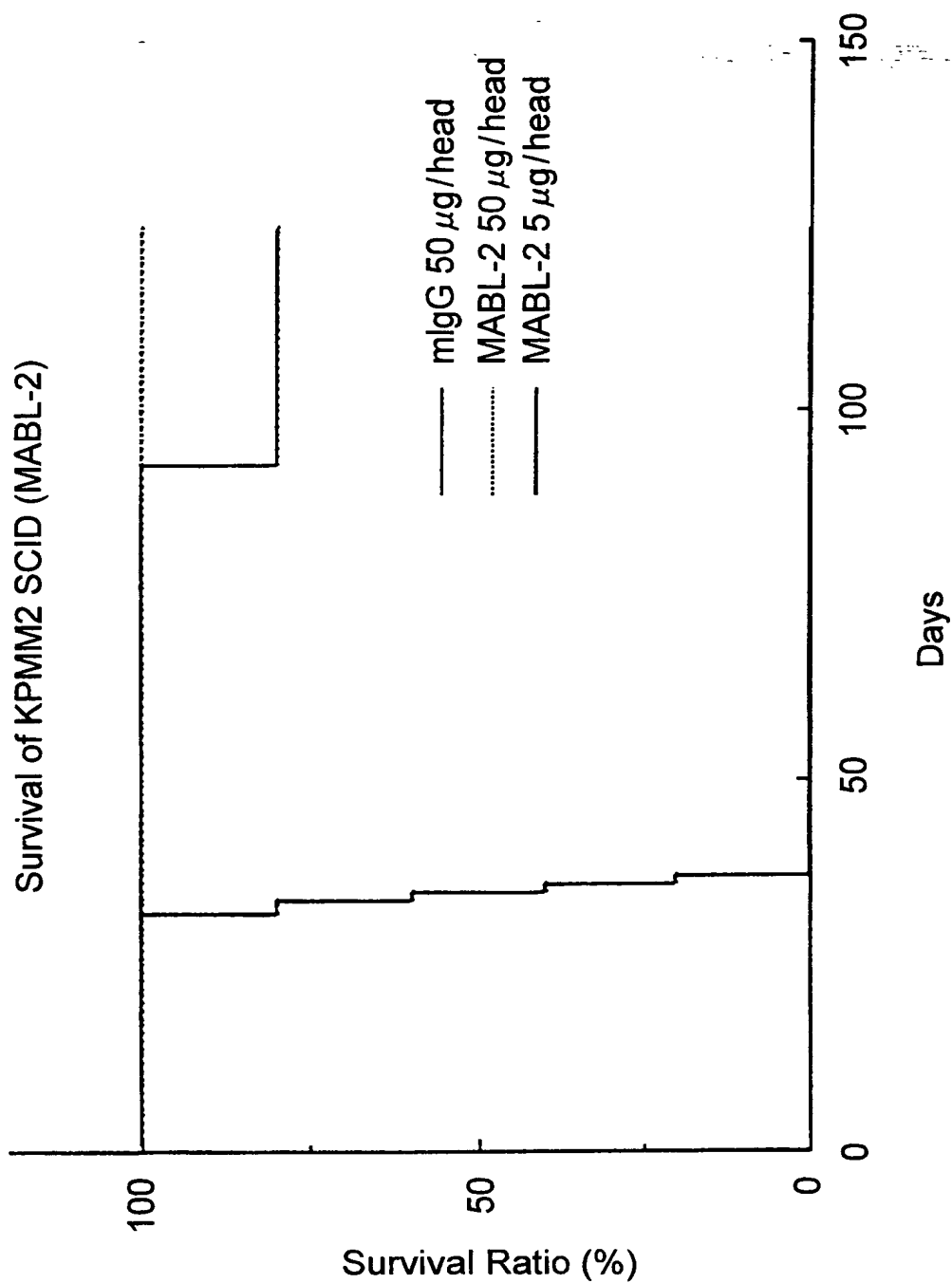
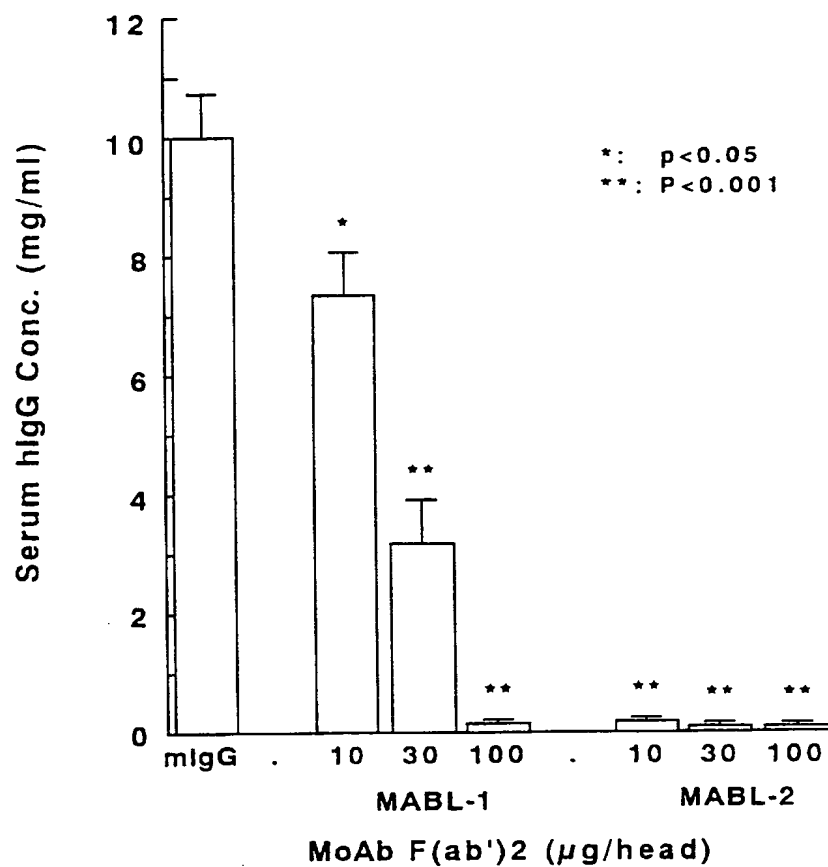


図27

hlgG Level in KPMM2 SCID (day30)



28

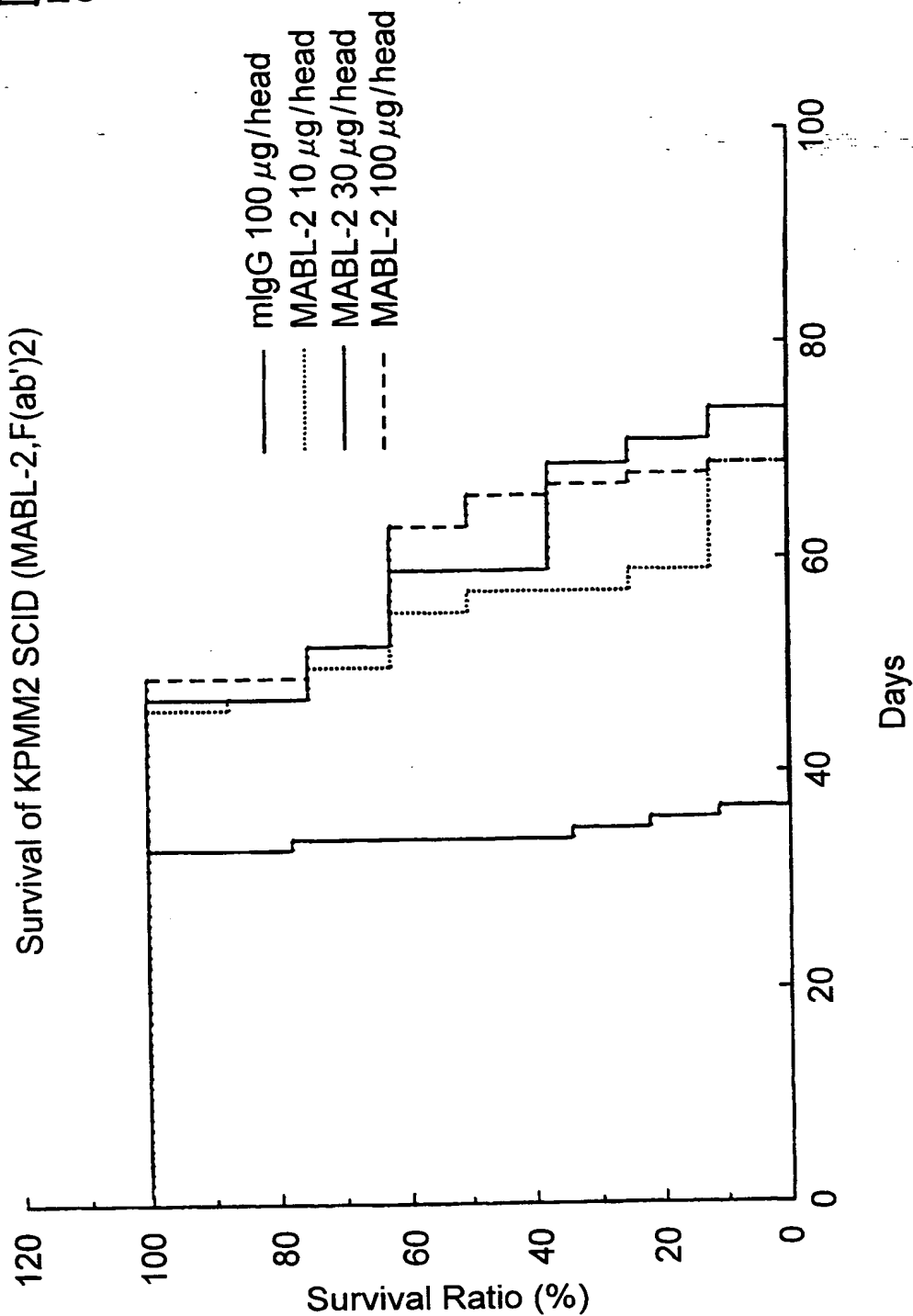
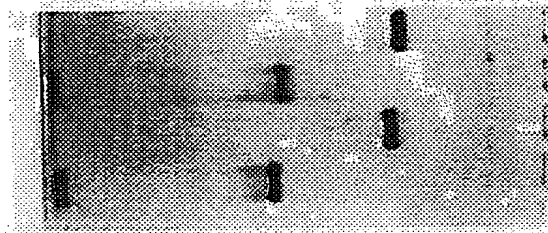


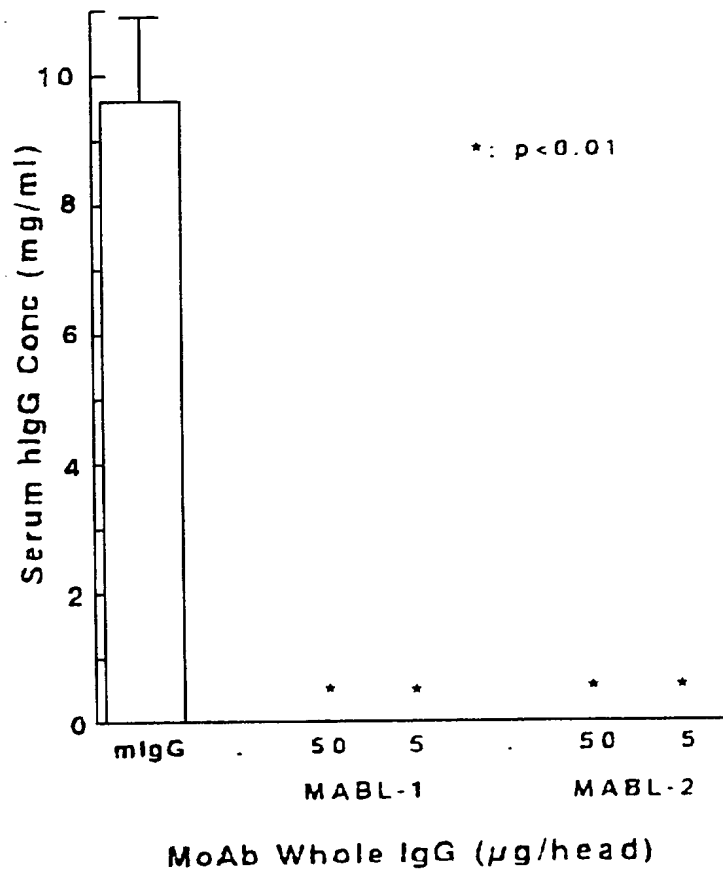
図29



← intact (whole) MABL-1
 ← MABL-1 F(ab)₂
 ← intact (whole) MABL-2
 ← MABL-2 F(ab)₂

図30

hIgG Level in KPMM2 SCID (day 28)



配列表

SEQUENCE LISTING

5 <110>CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120>Monoclonal antibody inducing apoptosis

<130>CGS98-03PCT

10 <160>2

<210>1

<211>26

15 <212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>PCR primer

20 <400>1

GCAAGCTTAT GTGGCCCCTG GTAGCG 26

<210>2

25 <211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

5 <230>PCR primer

<400>2

GCGGCCGCTC AGTTATTCCT AGGAGG 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K16/18, C07K16/28, C12N5/20, A61K39/395 // C12P21/08, C12N15/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K16/18, C07K16/28, C12N5/20, A61K39/395, C12P21/08, C12N15/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, 97/32601, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK), 12 September, 1997 (12. 09. 97) & JP, 9-295999, A & AU, 9722325, A	1-6
A	Journal of Cell Science vol. 108, No. 11 (1995) Martina I. Reinhold et al., "In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47)" p3419-3425	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 December, 1998 (11. 12. 98)Date of mailing of the international search report
22 December, 1998 (22. 12. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C07K 16/18, C07K 16/28, C12N 5/20, A61K 39/395
//C12P 21/08, C12N 15/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C07K 16/18, C07K 16/28, C12N 5/20, A61K 39/395,
C12P 21/08, C12N 15/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 97/32601, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK) 12. 9 月. 1997 (12. 09. 97) & JP, 9-295999, A & AU, 9722325, A	1-6
A	Journal of Cell Science vol. 108 No. 11 (1995) Martina I. Reinhold et al. "In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47)" p3419-3425	1-6

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 12. 98

国際調査報告の発送日

22.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449